

대퇴골두 무혈성 괴사에서 알코올이 골아세포의 VEGF-A, PEDF, VEGFR-2의 발현에 미치는 영향

이우석 · 정환용 · 김우식 · 전택수 · 김상범 · 김성훈 · 김선홍 · 임지혁 · 한창동*

건양대학교 의과대학 정형외과학교실, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실*

목 적: 배양된 골아세포에 알코올을 투여하여 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), pigmented epithelium-derived factor (PEDF), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2)의 발현에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

대상 및 방법: 대퇴골두 무혈성 괴사와 골절부의 대퇴골 전자간부에서 분리 배양한 골아세포에 알코올을 투여하고, 알코올 농도와 배양시기에 따른 세포 증식률, VEGF-A mRNA, PEDF mRNA, VEGFR-2 mRNA 발현을 측정하였다.

결 과: 알코올을 투여한 골아세포는 초기에 세포수가 증가하였고, 이후에는 감소하거나 변화가 없었다($p < 0.05$). 골괴사 군 중 고농도의 알코올(100, 150 mM)을 투여한 군에서는 VEGF-A/PEDF 비는 감소하였고, 대조군에서는 VEGF-A/PEDF 비가 증가하였다($p < 0.05$).

결 론: 골아세포 배양에서 알코올은 골아세포의 증식을 억제하고, VEGF-A/PEDF 비의 불균형을 유발하여, 골괴사 조직에서 신생혈관 형성을 억제할 것으로 생각되었다.

색인 단어: 골괴사, 골아세포, 알코올, VEGF-A, PEDF, VEGFR-2

Effect of Alcohol on the Expression of VEGF-A, PEDF, and VEGFR-2 of Osteoblast in Avascular Necrosis of Femoral Head

Woo-Suk Lee, M.D., Whan-Young Chung, M.D., Woo-Sik Kim, M.D., Taek-Soo Jeon, M.D., Sang-Bum Kim, M.D., Sung-Hun Kim, M.D., Sun-Hong Kim, M.D., Ji-Hyuk Lim, M.D., and Chang-Dong Han, M.D.*

Department of Orthopedic Surgery, Konyang University College of Medicine, Daejeon;

Department of Orthopedic Surgery*, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: The aim of this study was to determine the effect of alcohol on the expression of VEGF-A, PEDF, and VEGFR-2 in human osteoblasts.

Materials and Methods: Human osteoblasts primarily derived from the intertrochanteric region of the femur with osteonecrosis and fracture (control) were cultured with alcohol (0, 20, 100, 150 mM). The level of cell proliferation and the expression levels of VEGF-A mRNA, PEDF mRNA, and VEGFR-2 mRNA was evaluated according to the alcohol concentrations and the culture periods.

Results: Osteoblasts with the added alcohol showed an early increase in cell population, and a subsequent decrease or steady level thereafter compared with those without alcohol ($p < 0.05$). The osteoblasts in the osteonecrosis group showed an increase in VEGF-A mRNA and PEDF mRNA expression at high alcohol concentrations (100, 150 mM), resulting in a decreased VEGF-A/PEDF ratio, while those in the control group showed an increase in VEGF-A mRNA expression and a decrease in PEDF mRNA expression, resulting in an increase in the VEGF-A/PEDF ratio ($p < 0.05$).

Conclusion: Alcohol stops the proliferation of osteoblasts and can cause an imbalance between VEGF-A and PEDF, thereby inhibiting the neovascularization of osteonecrosis.

Key Words: Osteonecrosis, Osteoblast, Alcohol, VEGF-A, PEDF, VEGFR-2

통신저자 : 김 성 훈

대전시 서구 가수원동 685

건양대학교병원 정형외과

TEL: 042-600-6903 · FAX: 042-545-2373

E-mail: 216930@hanmail.net

Address reprint requests to

Sung Hun Kim, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, Konyang University Hospital, 685 Gasuwon-dong, Seo-gu, Daejeon 302-241, Korea

Tel: +82,42-600-6903, Fax: +82,42-545-2373

E-mail: 216930@hanmail.net

*본 논문의 요지는 2004년도 건양대학교 교수연구비의 지원에 의해 이루어졌음.

대퇴골두 무혈성 괴사의 원인은 아직까지 명확히 밝혀지지 않았지만 대퇴골두로 가는 혈행 차단을 주원인으로 보고 있다^{2,15)}. 우리나라에서는 알코올이나 스테로이드의 복용과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으나 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다^{2,9,15)}. 알코올은 골의 순환과 형성을 억제하고 골아세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되고 있으나 어떤 기전에 의해 골대사에 관여하는지 정확히 알려져 있지 않았고, 골괴사 후 골의 재생과 회복이 안 되는 이유를 설명하지 못하고 있다^{3,9,14,15,20)}.

골의 발생과 골 손상의 치유과정에서 혈관이 충분히 형성되어야 골형성에 필요한 연골세포, 골아세포, 파골세포 등을 유도할 수 있는데, 이 과정에서 골아세포와 내피세포간에 밀접한 관계가 필수적이다^{5,21,22)}. Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 이들의 관계에서 혈관형성에 중요한 역할을 할 것으로 보고 있으며, 인체의 모든 조직에서와 마찬가지로 골아세포에서도 생산되며 이에 대한 수용체도 합성하는 것으로 알려져 있다^{1,4,6-8,10,11)}. 안과 영역에서는 안질환의 혈관 재형성과 비정상적인 혈관형성이 중요한 관심사로 알려져 있는 바, 혈관 형성을 유도하는 VEGF와 이를 억제하는 pigmented epithelium-derived factor (PEDF)와 균형에 의해 조절되고 있는 것으로 보고되고 있다^{1,13)}. 그러나 근골격계에서는 이들 인자가 정상적인 골형성 과정과 혈관 형성과 관련된 골 질환에서 어떠한 작용을 하는지에 대한 연구가 적었다^{6,16,18,19)}. 최근의 연구에 의하면 VEGF-A와 PEDF는 근골격계를 형성하는 골아세포나 연골세포에서도 형성되어 골형성 과정에서 필수적인 혈관 형성에 영향을 주는 것으로 알려져 있으나 기존의 골아세포의 골 재형성과 동물실험에 국한되었고, 혈행 장애와 관련된 사람의 골 질환에서 이들 인자가 미치는 영향에 대한 연구는 없었다¹⁶⁾.

저자들은 대퇴골두 무혈성 괴사에서 VEGF-A, PEDF, VEGF 수용체 등의 인자의 변화와 상호 작용의 불균형이 질환의 원인될 수도 있고, 초기 혈행의 차단 후 혈관 재형성에 영향을 줄 수 있을 것으로 가정하였다^{10,13)}. 본 연구에서는 알코올에 의해 발생된 대퇴골두 무혈성 괴사 환자에서 골아세포를 채취하고 체외 배양을 시행하여, 알코올의 농도와 투여시간에 따른 골아세포 증식과 VEGF-A, PEDF, VEGF 수용체(VEGFR-2)의 발현정도를 분석하여 골괴사의 발생과 회복기전에 있어서 VEGF-A, PEDF,

VEGFR-2의 역할을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 골아세포의 분리 및 배양

대퇴골두 무혈성 괴사로 인공고관절 전치환술을 시행한 환자에서 수술시 대퇴골 전자간부에서 망상골을 채취하여 phosphate-buffered saline (PBS)으로 4회 세척을 실시한 다음 2×2 mm 크기로 잘게 잘랐다. 잘게 잘라진 시료에 0.25% trypsin/EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA) 4 ml을 넣고 금속봉으로 천천히 흔들면서 37°C로 맞춰진 수조에서 1시간 소화를 시킨 후 원심분리하여 상층액은 제거하였다. 남은 골조직을 2회 세척 후 10% 우태혈청이 함유된 low glucose Dulbecco's modified essential medium (DMEM)으로 25 cm² 배양용기에 일차배양(5% CO₂, 37°C incubator)을 하고, 배양액은 2일마다 교체하였다. 골아세포가 배양용기로 이동하여 배양되면, 골조직은 제거하고 배양된 골아세포는 계대배양하였다. 골아세포의 표현형 확인을 위하여 골아세포의 배양 중 β-glycerophosphate를 첨가하여 bony spicule이 형성되는 모습을 확인하였다. 대조군은 술을 못하거나 주 1회 이하의 음주력이 있는 환자 중 골절 수술과정에서 망상골을 채취하여 상기방법과 동일하게 골아세포를 일차 배양하였다.

2. 실험군

골괴사 환자에서 분리 배양한 골아세포를 배양용기에 4×10⁴ cell/ml씩 분주한 후 배양액에 알코올의 농도가 0, 20, 100, 150 mM이 되게 하고 2일마다 같은 농도가 유지되도록 배양액을 교체하였다. 배양 3, 7, 14, 21일째 세포를 분리하였다. 대조군으로 골절환자에서 분리 배양한 골아세포에서도 각 알코올 농도에 대한 동일한 과정을 시행하였다. 대상군은 환자와 보호자의 문진을 통해 평균 음주량이 21% 알코올로 800 ml/day 이상이고, 다른 질환이나 약물복용(steroid, immune depressant drug)의 기왕력이 없는 알코올 기인성 대퇴골두 무혈성 괴사 환자를 대상으로 하였으며, 골괴사 군과 대조군 간의 연령, 성별, 신장, 체중 등은 의미 있는 차이는 없었다(Table 1). 각각의 분리된 세포에서 세포수, VEGF-A, PEDF, VEGFR-2 mRNA 발현을 측정하였다.

Table 1. Demographic characteristics of the patients

Parameter	Osteonecrosis group (n=9)	Control group (n=7)	p-value
Age (yrs)	41.4±5.9	39.0±6.3	>0.05
Gender (M : F)	9 : 0	7 : 0	>0.05
Weight (kg)	62.9±8.4	64.2±9.5	>0.05
Height (cm)	167.1±6.6	167.3±7.1	>0.05
Alcohol intake (21% ml/day)	965±120.5	9±3.4	<0.05

All data are presented as the mean±one standard deviation.

3. 세포 증식률

세포 증식률은 각 군에서 분주 후 3, 7, 14, 21일째에 배양용기에서 세포를 분리한 후 0.4% trypan blue로 처리 후 혈구계로 세포수를 측정하였다.

4. VEGF-A, PEDF, VEGFR-2에 대한 mRNA 분석

배양 3, 7, 14일째에 각 군의 골아세포를 분리한 후 Easy-blue (iNtRON, Seongnam, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. Spectrophotometer로 정량한 total RNA 1μg과 희석된 primer 2 μl를 섞은 후, 70°C에서 5분 반응 후 Accupower RT premix kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 사용하여 42°C에서 1시간, 94°C에서 5분 반응시켜 VEGF-A cDNA를 합성하였다. Accupower PCR premix kit에 합성된 cDNA 용액 1 μl와 희석된 forward primer (5'-GCACTGGACCCT-GGCTTTAC-3'), reverse primer (5'-GGCTTTGTCT-ATCTTTCTTT-3')를 각각 0.5 μl 첨가한 후, 중합효소 연쇄반응(PCR)은 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 30초간의 합성과정을 35회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 5분간 합성반응을 시킨 후 반응액 중 5μl를 취하여 2% agarose gel에서 중합효소 연쇄반응 표지(PCR marker)와 같이 전기영동한 후 UV transilluminator에 관찰 후 촬영하였다. β-actin도 forward primer (5'-TTCTAC-AATGAGCTGCGTG-3'), reverse primer (5'-CTTGA-TCTTCATGGTGCT-3')를 사용하여 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 45초간의 합성과정을 35회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 10분간 합성반응을 시킨 후 전기영동하여 density를 측정하고 VEGF-A mRNA의 측정값

을 보정하였다.

PEDF의 forward primer (5'-TCACAGGCAAACCC-ATCAAGCTGAC-3'), reverse primer (5'-GCCITTCGTGCTCTGTGGAATCTGCT-3')를 사용하여 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 65°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 15초간의 합성과정을 35회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 5분간 합성반응을 시켰고, VEGFR-2 (forward; 5'-CAACAAAGTCGGGAGAG-GAG-3', reverse; 5'-ATGACGATGGA CAACTAGCC-3')의 RT-PCR은 94°C에서 5분간 변성, 94°C에서 30초 동안 변성, 45°C에서 30초 동안 annealing, 72°C에서 40초간의 합성과정을 35회 반복하였다. 최종으로 72°C에서 5분간 합성반응을 시킨 후 반응액 중 5μl를 취하여 2% agarose gel에서 중합효소 연쇄반응 표지와 같이 전기영동하여 측정하였고, β-actin mRNA의 측정값으로 보정하였다.

5. 통계학적인 분석

통계학적 분석은 BIO-PROFIL Bio-1D (VILBER LOURMAT, France)를 이용하여 분석하였다. 본 실험은 3회 이상 반복하여, 골괴사군과 대조군 간의 차이는 Mann-Whitney test를 이용하였으며, 알코올의 농도에 따른 차이는 ANOVA test를 이용하여 분석하였다. 검정 시 유의수준은 p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포 증식률

골괴사군과 대조군에서 알코올을 투여하지 않은 경우 세포수가 지속적으로 증가하였으나 골괴사군이 대조군에 비해 세포 증식률이 적었다($p < 0.05$). 알코올 20 mM 투여군은 세포수가 배양 7일째 5.8×10^5 ($\pm 1.1 \times 10^5$) cell/ml로, 알코올 150 mM 투여군은 세포수가 배양 3일째 6.4×10^5 ($\pm 1.3 \times 10^5$) cell/ml로 정점을 이룬 후 감소하였다. 대조군에서는 알코올 20 mM 투여군은 배양 14일째 7.1×10^5 ($\pm 1.1 \times 10^5$) cell/ml로, 150 mM 투여군의 세포수는 배양 3일째와 6.0×10^5 ($\pm 1.2 \times 10^5$) cell/ml로 정점을 이룬 후 일정하게 유지되어 양 군에서 알코올의 농도가 증가함에 따라 조기에 세포수가 증가하고 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 1).

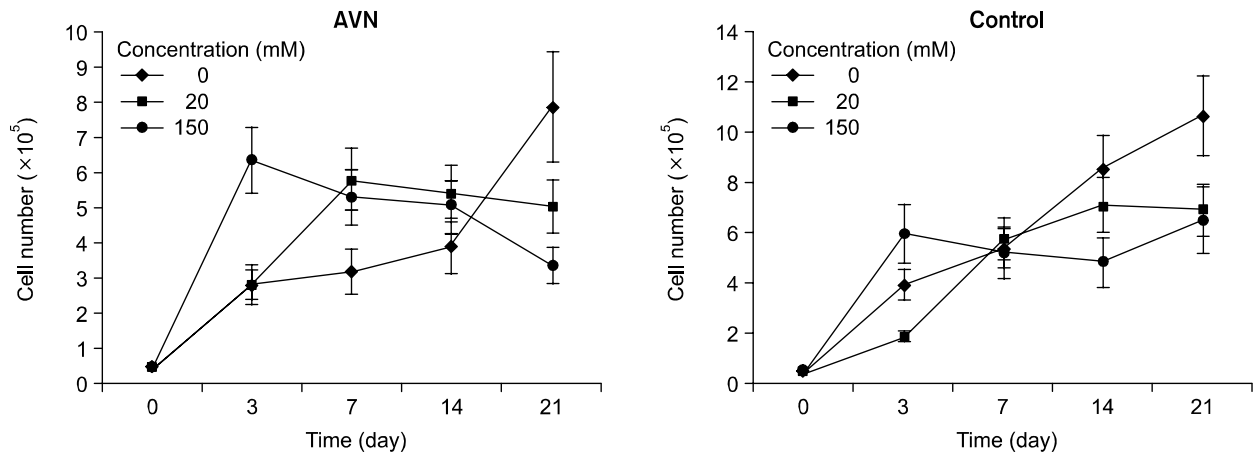


Fig. 1. Osteoblasts exposed to high concentrations of alcohol (100 mM, 150 mM) showed an early increase in cell population at day 3, and a decrease or a steady level at day 7 and day 14, while those in the osteonecrosis group (AVN) and control without alcohol showed a continuous increase to day 21 ($p < 0.05$).

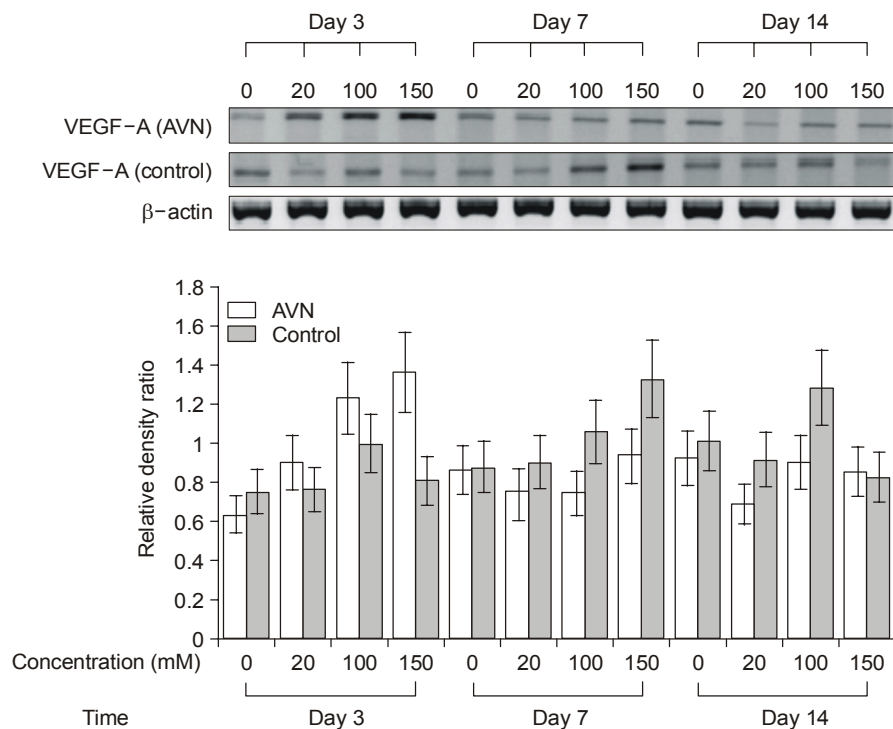


Fig. 2. The expression level of VEGF mRNA in the osteonecrosis group exposed to high concentrations of alcohol (100 mM, 150 mM) was higher than that of the control group at day 3 ($p < 0.05$). The expression of VEGF mRNA in the osteonecrosis group exposed to high concentrations of alcohol (100 mM, 150 mM) was lower than that of the control group at day 7 ($p < 0.05$).

2. VEGF-A, PEDF, VEGFR-2에 대한 mRNA의 발현

배양 3일째 골괴사군에서는 알코올의 농도가 증가함에 따라 VEGF-A mRNA의 발현은 증가하였고($p < 0.05$), 대조군에서는 변화가 없었다($p > 0.05$). 배양 7일째 골괴사군에서는 알코올 농도에 따른 VEGF-A mRNA의 발현에는 의미있는 변화는 없었으나 대조군에서는 고농도 알

코올 투여군(100 mM, 150 mM)의 VEGF-A mRNA의 발현이 증가하였다($p < 0.05$). 배양 14일째 골괴사군과 대조군 모두에서 알코올의 농도에 따른 VEGF-A mRNA의 발현의 변화는 없었다($p > 0.05$). 전 배양기간 중 알코올을 투여하지 않은 군과 저농도 알코올 투여군(20 mM)에서는 골괴사군과 대조군 간의 VEGF-A mRNA의 발현에

차이가 없었다($p>0.05$)(Fig. 2).

PEDF mRNA의 발현은 배양 3일째 알코올을 투여하지 않은 군보다 저농도 알코올 투여시 골괴사군과 대조군 모두에서 증가하였으나($p<0.05$), 고농도 알코올 투여시 골괴사군에서는 증가하고 대조군에서는 감소하였다($p<0.05$). 배양 7일째 양 군에서 알코올 농도에 따른 PEDF mRNA의 발현의 변화는 없었다($p>0.05$). 배양 14일째는 골괴사군과 대조군 모두에서 알코올 농도에 따른 의미 있는 변화는 없었으나 골괴사군이 대조군에 비해 PEDF

mRNA의 발현이 증가하였다($p<0.05$)(Fig. 3).

VEGF-A/PEDF 비는 알코올을 투여하지 않은 군과 저농도 알코올 투여시 양 군 간에 의미있는 차이는 없었으나, 고농도 알코올 투여시 골괴사군이 대조군에 비해 감소되었고, 특히 배양 3일째 양 군 간의 VEGF-A/PEDF 비의 차이가 가장 컸으며, 배양 7일째와 14일째에는 알코올 농도에 관계없이 골괴사군의 VEGF는 PEDF보다 낮았으며, 대조군의 VEGF는 PEDF보다 높게 유지되었다($p<0.05$)(Fig. 4).

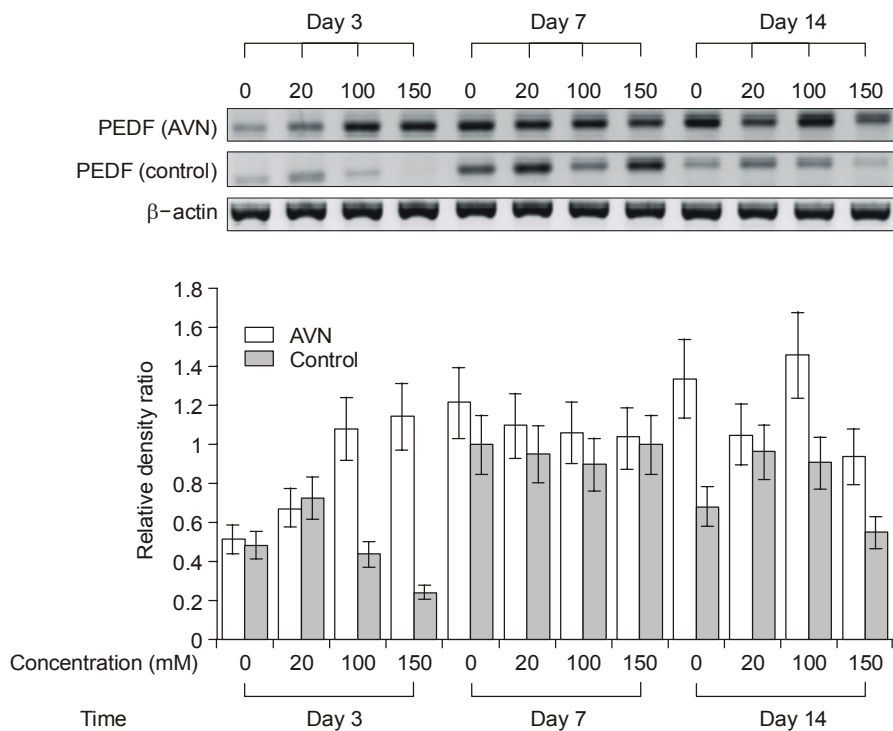


Fig. 3. The expression level of PEDF mRNA in the osteonecrosis group exposed to high concentrations of alcohol (100 mM, 150 mM) was higher than that of the control group at day 3 ($p<0.05$).

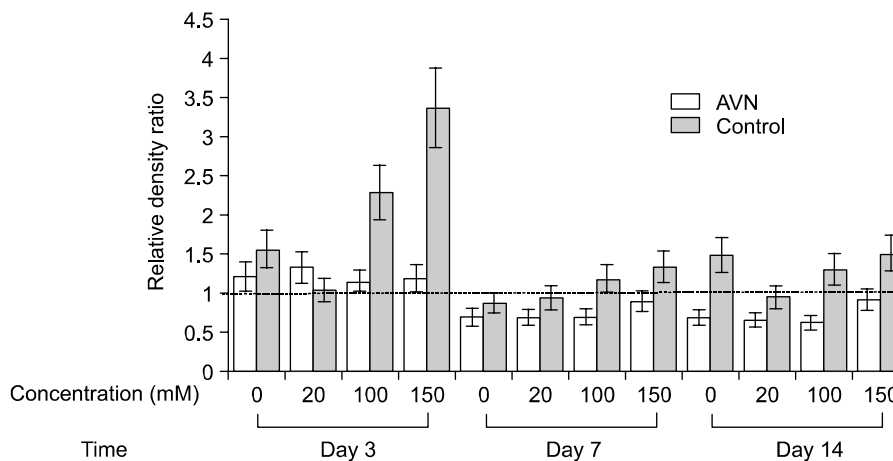


Fig. 4. VEGF-A/PEDF ratio in osteonecrosis group is lower than that of control group, especially on day 3 ($p<0.05$).

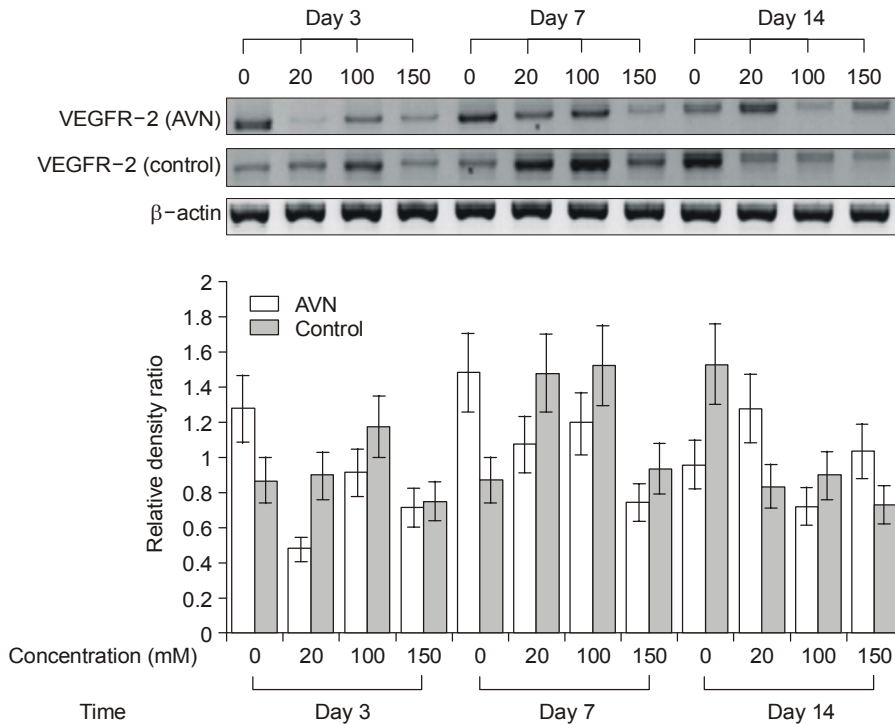


Fig. 5. The expression level of VEGFR-1 mRNA in both group was unaffected by alcohol at the concentration and culture periods used in this study ($p > 0.05$).

VEGFR-2 mRNA의 발현은 양 군에서 알코올의 농도와 배양기간에 따른 유의한 차이는 없었다($p > 0.05$) (Fig. 5).

고찰

대퇴골두 무혈성 괴사는 우리나라에서 인공 고관절 전치환술을 시행하는 가장 많은 원인이며, 남자에서는 알코올이 무혈성 괴사 원인의 대다수를 차지한다^{2,9,15}. 혈관 내 응고가 무혈성 괴사의 발생기전에 주된 역할을 할 것으로 보고 있지만 일관된 결과를 보여주고 있지 않으며, 알코올이 이 과정에 어떻게 작용하는지 정확하게 알지 못 하고 있다⁹. 여러 동물 실험에서 알코올을 투여하여 조혈작용의 감소, 지방세포의 비대, 골세포 내의 지방침착 등을 관찰하여 골괴사와 관련이 있을 수 있다는 보고들이 있었으며, 생체의 배양실험에서도 알코올의 투여 후 골아세포의 기질발현이 감소된다는 지골세포나 전구세포에서 지방세포로 분화되어 골괴사를 유발할 수 있다는 연구가 있었다^{3,9,14,15,20}.

저자들은 알코올에 기인한 골괴사의 발생 기전을 골조직의 특징인 골형성의 과정에서 정상적인 혈관형성이 되지 않아 발생할 수 있다는 가정을 하였다. 즉 골형성 과정

에서 혈관생성은 필수적인 과정으로 골괴사의 발생과정과 골괴사 발생 이후 재생과정에서 혈관형성이 제대로 일어나지 않아 골괴사가 발생하거나 진행할 수 있다⁴. 최근에 혈관생성에 중요한 인자로 알려진 VEGF와 억제인자인 PEDF가 골조직을 포함한 근골격계에서도 생성되는 것으로 밝혀지면서 골아세포에서 이들 인자의 발현과 상호작용에 의해 혈관생성 능력이 감소되고 이차적으로 골재형성에 지속적으로 영향을 미칠 수 있다고 판단하였다^{1,4,6-8,10,11,23}. 골괴사 환자에서는 알코올이 골아세포의 기질형성 능력을 감소시킨다는 보고가 있었으나 실제로 VEGF와 PEDF의 발현에는 어떤 영향을 미치는지 또한 음주력이 없는 사람과 차이, 알코올을 투여 후 골아세포의 반응에 대해서는 보고된 바가 없었다^{2,9,12,14,19}.

Gangji 등¹²은 생체의 골아세포 배양을 통해 골괴사 환자의 골아세포 증식이 대조군으로 사용한 골절환자와 비교하여 감소되었다고 보고한 바 있었는데, 본 연구에서도 알코올을 투여하지 않았음에도 불구하고 대조군에 비해 골괴사군의 골아세포 증식이 저하되어 있었다. 저농도의 알코올을 투여한 경우 골괴사군과 대조군에서 의미있는 변화를 보이지 않았으나 고농도 알코올 투여시 배양 초기에는 양 군의 골아세포의 증식이 초기에 증가하여 다른

보고자와 차이를 보였다^{9,12)}. 이러한 차이는 골아세포의 배양 초기에 알코올이 세포주기의 S-phase 비의 증가를 유발하여 일시적으로 나타난 현상을 판단되며, 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다¹⁷⁾. 그러나 배양기간과 알코올에 노출되는 시간이 증가함에 따라 골괴사군이나 대조군에서 알코올의 농도가 증가할수록 골아세포의 증식이 더욱 억제되었으며, 골괴사군에서는 골아세포의 수가 유지되지 못하고 감소하는 반면에, 대조군에서는 골아세포가 감소되지는 않고 유지되었다. 따라서 골괴사 환자의 골아세포는 세포증식능이 떨어져 있으며, 고농도의 알코올을 투여시 정상인보다 세포 증식능력이 더 떨어지는 것으로 생각된다.

VEGF는 사람에 있어서 생리적이거나 병적인 혈관형성에 있어서 주된 인자로 알려져 있으며, 저산소증이나 허혈성 변화에 반응하여 혈관형성의 중요한 매개인자로 작용한다¹⁰⁾. 최소한 5개 이상의 아형(VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D)이 발견되었으며, 이 중 VEGF-A가 성장기와 성인시기에 혈관형성에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{1,10)}. VEGF 수용체는 현재까지 3가지(VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3)가 발견되었는데, 성인 혈관에서는 VEGFR-2가 주된 VEGF의 수용체로 작용하는 것으로 보고 있다^{1,10)}. 혈관 형성 균형을 이루기 위해서는 VEGF-A와 같은 혈관 형성을 촉진인자와 더불어 억제인자가 필요한데, PEDF가 그 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다^{1,4,18)}. 이들 인자는 안과 영역에서 각막과 망막의 혈관형성 문제와 종양에서 신생혈관 형성 측면에서 많이 연구되었으나, 근골격계에서는 이들 인자가 발현된다는 정도의 연구에 머물렀다^{4,13)}. 본 연구에서는 골괴사가 어떠한 원인에 의해서 발생하던 다시 골재생이 잘 안되는 이유가 VEGF-A나 PEDF의 발현의 이상이나 이들의 불균형에 의해 괴사가 진행될 수 있다는 가정에서 출발하였다. 본 연구에서는 골괴사군이나 정상군 모두에서 알코올의 농도를 증가시키면 VEGF가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 PEDF는 정상군에는 감소하는 반면에 골괴사군에서는 증가하거나 변화가 관찰되지 않았으며, VEGF-A/PEDF 비를 비교한 결과 정상군에서는 VEGF-A가 높게 유지되는 반면에 골괴사군에서는 PEDF가 높게 유지되었다. 특히 배양 3일째에 고농도의 알코올을 투여한 경우 양 군에서 VEGF-A/PEDF 비의 차이가 가장 크게 나타나 골아세포의 배양초기에 고농도의 알코

올이 VEGF-A/PEDF 비의 불균형을 유발하는 것으로 판단되었다. 결론적으로 골괴사군에서는 고농도의 알코올을 투여할 경우 PEDF가 감소하지 않고 증가함으로써 혈관형성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 판단되어 대퇴골두 무혈성 괴사에서 혈관 재형성에 VEGF-A보다 PEDF가 더 중요한 조절인자의 역할을 하는 것으로 판단된다^{1,13)}. 골괴사에서 알코올이 어떤 기전에 의해 정상적인 PEDF의 발현을 촉진되는지는 알 수 없으나 VEGF-A/PEDF 비의 불균형이 혈관형성과 이차적인 골형성을 억제하여 골괴사를 진행시킬 수 있다는 점을 암시한다. 따라서 본 연구의 결과는 골괴사의 치료영역에 있어서 단순히 VEGF를 투여하거나 VEGF를 형성하는 유전자를 투입하여도 PEDF의 발현을 차단하지 못 하면 치료적인 효과가 없을 수도 있음을 암시하므로 향후 PEDF의 VEGF 조절기능에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다¹⁹⁾.

VEGF의 수용체도 혈관조직 외에 골아세포에서도 발현되는 것이 확인되었으나 골아세포에서는 어떤 작용을 하는지 명확히 밝혀져 있지 않았다^{1,4,18)}. 본 연구에서도 알코올의 농도와 배양기간에 따른 VEGF와 PEDF와의 상호관계를 확인하지는 못 하여 차후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 또한 PEDF를 골아세포에서 중요한 혈관형성 억제인자로 판단하여 연구하였지만 thrombospondin-1 (TSP-1)과 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)와 같은 인자들도 내피세포의 증식과 혈관 형성을 억제하는 것으로 알려져 있고, VEGF 계열 외에 fibroblast growth factor-2 (FGF-2)도 혈관생성에 중요한 인자로 보고되고 있어 이들 인자들에 대한 광범위한 연구가 필요할 것으로 생각된다^{1,5)}.

결론

대퇴골두 무혈성 괴사 환자의 골아세포 배양에서 알코올의 농도에 비례하여 골아세포의 증식은 감소하였으며, PEDF의 발현이 증가로 VEGF/PEDF 비의 불균형을 유발하여 신생혈관 형성을 억제하고, 골괴사의 치유와 진행에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Aparicio S, Swant S, Lara N, Barnstable CJ and Tombran-Tink J: Expression of angiogenesis factors in human umbilical endothelial cells and their regulation by PEDF. *Biochem Biophys*

- Res Commun*, 326: 387-394, 2005.
2. **Assouline-Dayana Y, Chang C, Greenspan A, Shoenfeld Y and Gersh ME:** Pathogenesis and natural history of osteonecrosis. *Semin Arthritis Rheum*, 32: 94-124, 2002.
 3. **Atmani H, Chappard D and Basle MF:** Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *J Cell Biochem*, 89: 364-372, 2003.
 4. **Barnstable CJ and Tombran-Tink J:** Neuroprotective and angiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res*, 23: 561-577, 2004.
 5. **Carano RA and Filvaroff EH:** Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*, 8: 980-989, 2003.
 6. **Chen YJ, Wurtz T, Wang CJ, et al:** Recruitment of mesenchymal stem cells and expression of TGF-beta 1 and VEGF in the early stage of shock wave-promoted bone regeneration of segmental defect in rats. *J Orthop Res*, 22: 526-534, 2004.
 7. **Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, et al:** Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, 143: 1545-1553, 2002.
 8. **Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE and Lowik CW:** Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*, 141: 1667-1674, 2000.
 9. **Eriksson CJ:** The role of acetaldehyde in the actions of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 25: 15S-32S, 2001.
 10. **Ferrara N:** VEGF and its receptors. *Int Congr Ser*, 1262: 283-286, 2004.
 11. **Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, et al:** Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *J Biochem*, 133: 633-639, 2003.
 12. **Gangji V, Hauzeur JP, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T and Egrise D:** Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol*, 30: 348-351, 2003.
 13. **Gao G, Li Y, Zhang D, Gee S, Crosson C and Ma J:** Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett*, 489: 270-276, 2001.
 14. **Gong Z and Wezeman FH:** Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 28: 468-479, 2004.
 15. **Jones LC and Hungerford DS:** Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment. *Curr Opin Rheumatol*, 16: 443-449, 2004.
 16. **Kim HK, Bian H, Randall T, Garces A, Gerstenfeld LC and Einhorn TA:** Increased VEGF expression in the epiphyseal cartilage after ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *J Bone Miner Res*, 19: 2041-2048, 2004.
 17. **Santillano DR, Kumar LS, Prock TL, Camarillo C, Tingling JD and Miranda RC:** Ethanol induces cell-cycle activity and reduces stem cell diversity to alter both regenerative capacity and differentiation potential of cerebral cortical neuroepithelial precursors. *BMC Neurosci*, 13: 59, 2005.
 18. **Tombran-Tink J and Barnstable CJ:** Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A, isoforms and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 316: 573-579, 2004.
 19. **Vadasz Z, Misselevich I, Norman D, Peled E and Boss JH:** Localization of vascular endothelial growth factor during early reparative phase of the rat's vessels deprivation-induced osteonecrosis of the femoral heads. *Exp Mol Pathol*, 77: 145-148, 2004.
 20. **Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q and Wang GJ:** Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*, 410: 213-224, 2003.
 21. **Wurtz T, Kruger A, Christersson C and Lundmark C:** A new protein expressed in bone marrow cells and osteoblasts with implication in osteoblast recruitment. *Exp Cell Res*, 263: 236-242, 2001.
 22. **Yoo JU and Johnstone B:** The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, 355: 73-81, 1998.
 23. **Zelzer E, McLean W, Ng YS, et al:** Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*, 129: 1893-1904, 2002.